

# 肺炎克雷伯氏菌荚膜多糖的提取纯化及其对细胞免疫活性的影响 Extraction and Purification of the *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide and the Effect on the Cell Immunoactivity

张 燕<sup>1\*</sup>, 李轻舟<sup>1</sup>, 杜连祥<sup>1</sup>, 戚 薇<sup>1</sup>, 陈锦英<sup>2</sup>

ZHANG Yan<sup>1\*</sup>, LI Qing-Zhou<sup>1</sup>, DU Lian-Xiang<sup>1</sup>, QI Wei<sup>1</sup> and CHEN Jin-Ying<sup>2</sup>

1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300222

2. 天津医科大学医学微生物学院, 天津 300070

1. College of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China

2. College of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

**摘 要** 采用液体深层培养得肺炎克雷伯氏菌 Kp-9 株发酵液, 研究确立了菌体快速裂解条件: NP40 1% 和胰蛋白酶 250IU/g 菌体, 50℃ 作用 1h, 然后加入溶菌酶 80μg/mL, 56℃ 作用 1h; 裂解液经超滤浓缩和有机溶剂沉淀获得多糖粗品; 多糖粗品先后经 CTAB 吸附分离, DEAE-Sephacryl Fast Flow 离子交换和 Sephacryl S-300HR 凝胶过滤纯化, 得分子量分布相对均一的多糖纯品, 产品得率为 0.251g/L。采用淋巴细胞转化实验分别探讨了多糖粗品和纯品的免疫活性, 研究显示荚膜多糖具有高效的体外细胞免疫活性, 并具有典型的双向免疫调节作用。研究结论为肺炎克雷伯氏菌荚膜多糖的开发奠定了前期基础。

**关键词** 肺炎克雷伯氏菌, 荚膜多糖, 提取, 纯化, 细胞免疫活性

中图分类号 Q93.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0461-05

**Abstract** *Klebsiella pneumoniae* was cultured followed by the preparation and immunoactivity elucidating of its polysaccharide (CPS). The lysis of cell is the first key step in the preparation, under the co-action of trypsin, lysozyme and NP-40, the cell lysed within 2h, then the lysate was concentrated by ultrafiltration which serves as concentrating and partial purifying action simultaneously. Crude CPS was got by ethanol precipitation, then purified through the Ion-exchange and gel filtration, the purity of CPS was judged by the gel filtration and agarose gel electrophoresis. The effect of CPS on the cell immunoactivity was studied in detail, the results show that CPS possesses bidirectional immunoregulation on the spleen cells of mice, that is, low concentration of CPS can stimulate the immune response while the high concentration manifests the inhibition significantly. The investigation results will benefit on the exploitation of the CPS.

**Key words** *Klebsiella pneumoniae*, polysaccharide, extraction, purification, immunoactivity

对于感染性疾病的治疗, 抗生素已表现出很大的局限性, 人们已逐渐转向通过增强机体的免疫力

来达到预防和治疗的目的。肺炎克雷伯氏菌(KP)以丰厚荚膜著称, 是一种常见于人类呼吸道和肠道

Received: November 1, 2004; Accepted: December 10, 2004.

\* Corresponding author. Tel: 86-22-60273282; E-mail: yzhang@tust.edu.cn

的条件致病菌,国内外很多研究集中在 KP 的耐药机制上,同时其荚膜的毒力也引起研究者极大兴趣,利用其荚膜的免疫活性,法国罗素公司已将其开发成一种免疫调节药物,对反复发作的上呼吸道感染有特殊疗效<sup>[2]</sup>。

荚膜多糖(CPS)是肺炎克雷伯氏菌荚膜中一类重要物质,由于不同菌株的荚膜结构及构型不尽相同,CPS 的结构也非常复杂,决定于糖链的大小,分枝数目,单糖的组成等。国外有很多关于不同菌株的多糖结构的报道,分子量多在 10 万以上,多为葡萄糖,半乳糖等组成的杂多糖<sup>[1]</sup>。目前关于 CPS 单独活性的研究及开发尚未见报道,鉴于多糖对机体的免疫调节活性具有广泛的影响,我们希望对 CPS 进行系统研究,将其开发成免疫调节药物,由于采用临床分离的致病株具有国内 Kp 血清型流行特征,CPS 的开发将更适于国内人群。

本文对 CPS 的制备工艺及对细胞免疫活性的影响进行了研究,为 CPS 的开发奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*, Kp)Kp-9 株,临床分离并鉴定。

BALB/C 小鼠购自天津医科大学动物中心,RPMI1640 培养液,Hanks 购自 GIBCO 公司;MTT,ConA,CTAB,溶菌酶购自 Sigma 公司;胰蛋白酶为上海生工产品;DEAE-Sephacryl Fast Flow,Sephacryl S-300HR 购自 Pharmacia;细胞培养板购自 NUNC 公司;荚膜多糖抗体由实验室自制;酶联抗体购自华美公司;全波长酶标仪为 Thermo Labsystems 产品。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 荚膜多糖检测方法:

糖含量测定:苯酚-硫酸法<sup>[10]</sup>。

定性方法:免疫斑点法<sup>[3]</sup>,以显色的深浅分为 1、2、3、4、5 五个等级进行比较。

定量方法:以实验室自制荚膜多糖为免疫原,制备多克隆抗体,抗体先后经硫酸铵分级沉淀和大肠杆菌菌粉吸附纯化,经交叉反应实验证明纯化后抗体对荚膜多糖的高特异性后,采用已建立的间接 ELISA 法定量检测,方法参考前期研究论文<sup>[4]</sup>。

1.2.2 肺炎克雷伯氏菌的液体深层培养<sup>[5]</sup>:KP-9 株经 LB 液体培养基活化,小鼠体内复壮,LB 平板划线 37℃ 培养至长出单菌落;经革兰氏染色、荚膜染色验证为肺炎克雷伯氏菌且无杂菌后,取一环菌接入装

有 25mL 种子培养基的 250mL 三角瓶中,于 37℃,180r/min 振荡培养 5h 至对数生长期;取种子培养液以 2% 接种量接入装有 4L 发酵培养基的 7L 发酵罐,37℃,自然 pH,通气量 75~350L/h,搅拌转速 200~600r/min,培养 3.5h 终止发酵。

1.2.3 提取工艺:经菌体裂解,裂解液浓缩,有机溶剂沉淀得荚膜多糖粗品。

1.2.4 多糖纯化:多糖粗品先后经 CTAB 吸附分离<sup>[6]</sup>,离子交换层析和凝胶过滤纯化<sup>[7]</sup>。

1.2.5 荚膜多糖纯度鉴定<sup>[7,8]</sup>:

凝胶过滤:取纯化后 CPS,上 Sephacryl S-300HR 柱( $\phi 1.6\text{cm} \times 50\text{cm}$ ),用超纯水洗脱,紫外 280 nm 和硫酸-苯酚法检测,以洗脱液管数为横坐标,吸光值为纵坐标作图。

琼脂糖凝胶电泳:CPS 用 0.8% 琼脂糖凝胶水平电泳分离,分别用考马斯亮蓝 R-250,甲苯胺蓝染蛋白和糖。

1.2.6 细胞免疫活性测定<sup>[3]</sup>:采用 ConA 体外刺激淋巴细胞增殖试验(MTT 法)。

## 2 结果

### 2.1 菌体裂解

荚膜多糖通过共价键与菌体外膜相连,因此多糖的提取必须首先对菌体进行处理,使多糖游离出来,实验采用了胰蛋白酶结合溶菌酶及 NP40 共同作用的方法。

2.1.1 NP40 用量确定:NP40 是非离子型表面去垢剂,起到增溶的作用,并且对物质结构和生物活性没有破坏作用。去垢剂与膜的比例是增溶的关键因素,通过实验证明 1% (V/V) NP40 添加量能起到很好的助溶作用。

2.1.2 胰蛋白酶最适用量的确定:分别采用终浓度为 1000IU、500IU、250IU、100IU/g 菌体的胰蛋白酶,再加入 1% (V/V) NP40,于 50℃ 处理发酵液 1h。通过荚膜染色观察,发现除胰蛋白酶浓度为 100IU/g 的菌体还保留部分荚膜以外,其余各组菌体的荚膜基本解体。然后加入溶菌酶 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,于 56℃ 作用 1h,通过细胞壁染色,发现除了 100IU/g 菌体组的菌体未完全裂解外,其余各组菌体均完全裂解。以上结果说明在发酵液中加入 250IU/g 菌体的胰蛋白酶足以使荚膜完全解体,结合溶菌酶作用,可以使菌体在 2h 内完全裂解,大大缩短了菌体裂解周期,而且通过 ELISA 检测发现新工艺所得裂解液的 ELISA 活性值远高于原工艺<sup>[9]</sup>裂解液(图 1,表 1)。

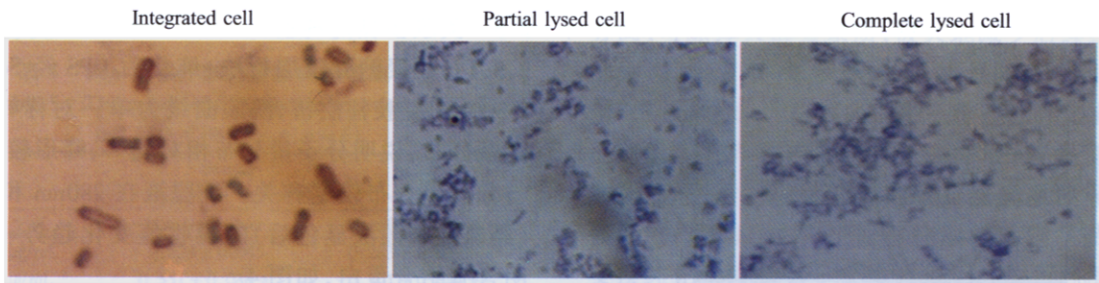


图1 Kp 裂解过程细胞壁染色的光学显微镜观察(1000)

Fig.1 Shapes of *Klebsiella pneumoniae* seen using light microscopy(1000)

表1 裂解液中 CPS 的 ELISA 检测

Table 1 Assay of CPS in the lysate by ELISA

	ELISA
New process	1.55
Original process	1.36

最终确定 Kp 的裂解工艺为:发酵液首先加入 NP40 1% 和胰蛋白酶 250IU/g 菌体,50℃作用 1h, 然后加入溶菌酶 80 $\mu$ g/mL,56℃作用 1h。

## 2.2 裂解液的浓缩

根据荚膜多糖的分子量范围大致在 90kD, 选择了 50kD 的超滤膜在对裂解液进行浓缩。浓缩至原裂解液体积的 1/6, 对原裂解液(稀释 4 倍)、滤出液和浓缩液(稀释 24 倍)分别进行 ELISA 检测, 表 2。

表2 超滤的浓缩效果

Table 2 Effect of concentration by ultrafiltration

	ELISA
Original lysate	2.665
Condensed lysate	2.513
Filtrate	0.154

表3 不同有机溶剂对 CPS 的沉淀作用

Table 3 Effect of organic solvent on the precipitation

Organic solvent	Ethanol 1 + 4	Ethanol 1 + 5	acetone 1 + 4	Ethanol: acetone(1:1)1 + 4	Methanol: methylal(1:4)1 + 4
ELISA $OD_{490}$	0.635	0.862	0.857	0.806	0.925
Yield/(g/L)	1.93	3.20	3.48	3.20	3.60

## 2.4 多糖的纯化

**2.4.1 CTAB 分离:**CTAB 与多糖能特异结合形成沉淀, 可将多糖与大部分杂质分开。粗品制成 1% 的水溶液, 加入 0.8 倍体积的 3% 的 CTAB, 搅拌 1h, 静置 2h, 离心收集沉淀, 加入 10% 的 NaCl 溶液, 溶解沉淀。再加入 4 倍体积的乙醇沉淀 1h, 离心收集沉淀, 用乙醇洗涤沉淀, 去除 CTAB。直至上清液中加入硫酸钾无沉淀生成, 干燥沉淀, 得荚膜多糖 CPS (*Klebsiella pneumoniae* Capsule Polysaccharide), 纯化效

超滤后的小分子滤出液, 其 ELISA 检测值很低, 而原液和浓缩液活性很高, 并且浓缩液与原裂解液的 ELISA 活性相近, 分别为 2.513 和 2.665, 回收率达到 94.3%, 说明实验选择的滤膜对荚膜多糖具有很好的截留作用, 经超滤后有效成分损失很少。

## 2.3 荚膜多糖沉淀

比较了乙醇、甲醇、丙酮、甲缩醛几种有机溶剂单独或组合使用对荚膜多糖的沉淀效果, 取同样的浓缩裂解液 10 份, 各 50mL, 分 5 组, 分别加入不同比例的有机溶剂, 振荡 1h 后, 离心收集沉淀, 干燥, 称重, 计算沉淀得率。准确称量干燥后的沉淀各 1mg 溶解于 10mL 包被剂中, ELISA 法检测荚膜多糖含量, 表 3。经甲醇-甲缩醛沉淀的粗提物, 无论是得率还是有效成分含量都是最好的, 80% 丙酮与 86% 乙醇沉淀效果相当, 由于甲醇 + 甲缩醛成本很高, 同时考虑到操作和 product 安全问题, 最终确定采用加入 5 倍体积乙醇沉淀荚膜多糖。

率见表 4。

**2.4.2 离子交换层析:**根据静态实验结果, 通过柱层析条件实验, 确定了多糖离子交换层析条件, 上样缓冲液为 pH9.0 的 Tris-HCl 溶液, 上样流速为 0.2mL/min, 用含 0.05 mol/L 氯化钠的 pH9.0 Tris-HCl 溶液洗脱杂质, 流速为 1mL/min, 至无糖和蛋白吸收, 洗脱缓冲液为含 0.4 mol/L 氯化钠的 pH9.0 Tris-HCl 溶液, 洗脱流速为 1mL/min, 见图 2。

0.05 mol/L 氯化钠的 pH9.0 Tris-HCl 溶液洗杂

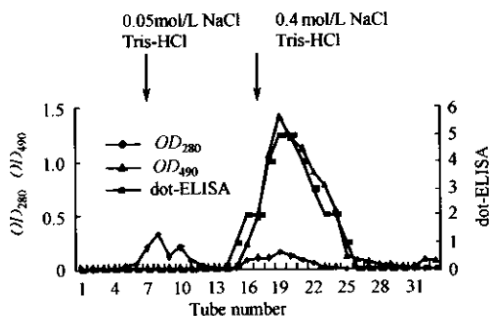


图2 CPS的离子交换色谱图

Fig. 2 Chromatography of CPS on ion exchange column

质时,出现两个蛋白吸收,但无糖吸收,免疫斑点检测无反应;换成0.4 mol/L氯化钠的Tris-HCl pH9.0溶液洗脱时,出现很高的糖吸收并有较弱的蛋白吸收,同时免疫斑点反应强,洗脱峰型不对称,说明洗脱组分不均一,收集免疫斑点阳性组分,浓缩,进行凝胶过滤层析。

**2.4.3 凝胶过滤层析:**根据多糖树脂分离范围,选择Sephacryl S-300HR型树脂,床体积为150mL,柱径为16mm,通过上样量和洗脱流速的选择实验,确定了较好的分离条件,上样流速为0.2mL/min,洗脱流速0.5mL/min,见图3。

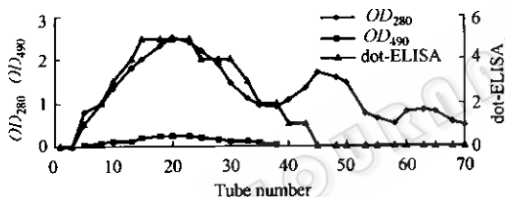


图3 CPS凝胶过滤色谱图

Fig.3 Chromatography of CPS on gel filtration column

组分检测结果显示,大分子荚膜多糖最先被洗脱,且糖和蛋白吸收与免疫斑点峰位置吻合,为目标产物;随后洗脱组分的糖吸收明显,但无蛋白吸收,免疫斑点反应较弱,表明与目标多糖的抗体特异性差,推测可能为一些分子量稍小而结构相近的多糖和寡糖等非目标产物。据免疫斑点检测结果收集15-33管相应洗脱液,冻干,得Kp荚膜多糖,纯度待检。

**2.5 荚膜多糖的纯度**

**2.5.1 葡聚糖凝胶层析法:**纯化后CPS经Sephacryl S-300HR凝胶柱层析,洗脱曲线为单一对称峰,且呈高斯分布,说明分子量分布相对均一,峰形较宽可能与分子量分布较宽有关。洗脱液在280nm和490nm(经硫酸苯酚法显色后)的吸收值变化趋势一致,表明含有结合蛋白,如图4。

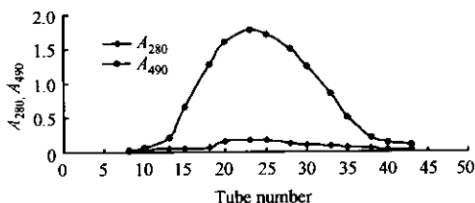


图4 CPS Sephacryl S-300HR凝胶过滤色谱图

Fig.4 Chromatography of CPS on Sephacryl S-300HR column

**2.5.2 琼脂糖凝胶电泳:**经琼脂糖凝胶电泳后,用考马斯亮蓝和甲苯胺蓝分别染色,结果见图5。胶带均出现单一斑点,两种染色方法显示的斑点出现在相同的位置,进一步表明荚膜多糖分子量分布相对均一,且含有蛋白。

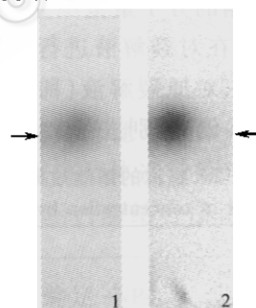


图5 CPS的琼脂糖凝胶电泳

Fig.5 Purity determination of CPS by agarose gel electrophoresis  
1: dyed by Coomassie blue R-250; 2: dyed by Toluidine Blue.

**2.6 荚膜多糖的纯化效率**

取荚膜多糖粗提物500mg,按确定的工艺首先进行CTAB处理,后经两步柱层析分离,每一步纯化产物测定干重,经ELISA法检测有效成分含量,计算得率和纯化效率,换算成每升发酵液的产量,结果见表4。

表4 荚膜多糖的纯化效率

Table 4 Comparison of different purified product

	Yield/(g/L)	Content of valid product / %	Yield of valid product/(g/L)	Recovery/ %	Purify degree
Crude product	4.2	18.2	0.764		
CTAB treated	2.02	30.5	0.616	80.6	1.67
Purified product	0.251	95.2	0.239	38.4	5.23

**2.7 细胞免疫活性研究**

分别将多糖粗品和纯品按质量稀释为5μg/mL、

10μg/mL、20μg/mL、40μg/mL、80μg/mL、160μg/mL进行淋巴细胞转化实验,观察各组不同剂量下的刺激作

用,见表5。

表5 Con A 体外刺激淋巴细胞增殖试验  
Table 5 The result of lymphocyte transformation test with CPS ( $x \pm s, n = 6$ )

	Sample	
	$A_{570nm} (x \pm s, n = 6)$	
	Crude product	Purified product
160 $\mu$ g/mL	0.524 $\pm$ 0.045	0.283 $\pm$ 0.027 *
80 $\mu$ g/mL	0.551 $\pm$ 0.036 *	0.301 $\pm$ 0.044 *
40 $\mu$ g/mL	0.612 $\pm$ 0.051 *	0.424 $\pm$ 0.053 *
20 $\mu$ g/mL	0.661 $\pm$ 0.053 *	0.553 $\pm$ 0.059 *
10 $\mu$ g/mL	0.636 $\pm$ 0.041 *	0.640 $\pm$ 0.061 *
5 $\mu$ g/mL	0.593 $\pm$ 0.050 *	0.685 $\pm$ 0.059 *
Negative control	0.389 $\pm$ 0.038	
Positive Control	0.530 $\pm$ 0.046	

\* Compared with the control ( $P < 0.01$ ).

纯品组荚膜多糖在 5 $\mu$ g/mL ~ 20 $\mu$ g/mL 范围内对细胞增殖有明显的促进作用,浓度越低刺激作用越强,与对照组相比差异显著,并呈剂量依赖关系,40 $\mu$ g/mL ~ 160 $\mu$ g/mL 时刺激增殖作用消失,呈明显的抑制作用,结果提示肺炎克雷伯氏菌荚膜多糖能够刺激淋巴细胞增殖,并对细胞免疫功能具有双向调节作用。粗品组 5 ~ 20 $\mu$ g/mL 时有明显的促进作用,并成剂量依赖关系,但随着浓度降低,刺激作用减弱;40 ~ 160  $\mu$ g/mL 时,随着浓度增加,刺激作用减弱,160 $\mu$ g/mL 时刺激作用减弱或消失,推测在实验浓度范围外的高剂量将出现明显的抑制作用,而实验浓度范围外的低剂量将失去增殖作用,如果按粗品中主成分含量推算,粗品组的调节作用规律与纯品的作用相同。这说明了粗品中含有一定比例的杂质,并且这些成分对免疫调节作用没有影响。

### 3 讨论

Kp 为革兰氏阴性细菌,表面结构复杂,其肽聚糖层外还有外壁层,因此溶菌酶作用效果较差,并且 Kp 菌体外包裹着很厚的一层荚膜,溶菌酶也很难直接作用于菌体的细胞壁。文献[7]报道,弱酸、弱碱、特定蛋白酶以及物理作用均可以促使荚膜物质解体。故实验采用不同浓度  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  及不同弱碱性环境、超声波作用、超声波结合溶菌酶裂解、胰蛋白酶结合溶菌酶裂解等多种方式进行裂解条件筛选,通过镜检观察,在多组实验中,胰蛋白酶结合溶菌酶及 NP40 组的裂解作用最快。

有机溶剂沉淀多糖前浓缩裂解液,可减少大量溶剂消耗。中空纤维超滤通过分子量截留实现液体的浓缩,不加热液体,能耗低,浓缩效率高。浓缩的同时,可滤除裂解液中的多数小分子物质,包括无机盐、小分子蛋白、小分子糖、色素等,起到部分纯化作用。

多糖纯化中首先利用 CTAB 与多糖的吸附进行

分离,可除掉大部分杂质,极大地减少后续纯化步骤的压力。Kp 荚膜多糖含弱酸性成分,因此采用 DEAE-Sepharose Fast Flow 弱碱型阴离子交换树脂进行纯化。上样采用 Tris-HCl 缓冲液,首先通过静态实验,分别对上样缓冲液的 pH、洗脱缓冲液的离子强度进行测试,进一步通过柱层析确定了多糖离子交换纯化条件。离子交换纯化后产物再经凝胶过滤纯化时由于采用纯水做流动相,终产物不需脱盐,减少了操作步骤。

多糖纯品实质上是指具有一定分子量范围的相对均一组分,即使是纯品,也存在微观不均一的问题。我们利用两种方法验证了纯化后多糖的均一性。

免疫活性研究中,选择经典的淋巴细胞转化实验分别探讨了多糖粗品和纯品的细胞免疫活性,研究显示 CPS 高效的体外细胞免疫活性,并具有典型的双向调节作用。免疫活性研究结果提示 CPS 具有很好的开发前景,对其免疫活性及其他活性的研究正在顺利进行。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Ajit Varki, Richard Cummings, Jeffrey Esko *et al.* Essentials of Glycobiology. California: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2002
- [2] Rudent A, Fournier JM, Meroni PL *et al.* Enhancement of resistance to experimental infections by a purified immune modulator of bacterial origin (Bostim). *Int J Immunopharmac*, 1982, (4): 256 - 260
- [3] Zhu LP(朱立平), Chen XQ(陈学清). Immunology Techniques. Peking: Publishing Company of People Hygiene, 2000
- [4] Li QZ(李轻舟), Zhang Y(张燕), Qi W(戚薇) *et al.* The enzyme-linked immunosorbent assay of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. *Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)*, 2004, 31(6): 567 - 571
- [5] Gao HJ(高海军), Chen J(陈坚), Zhang YF(章燕芳) *et al.* Nutrition condition of hyaluronic acid fermentation with *Streptococcus zooepidemicus*. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2000, 16(3): 396 - 399
- [6] Hirsch J, Buret J. Glycoprotein extracted from microorganisms. US Patent, 3855197. 1974
- [7] Frederick M Ausubel, Smith JA, Kingston RE *et al.* Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed. Peking: China Science Press, 2001
- [8] Mo W(莫伟), Zhang YL(张艳玲), Wang LS(王龙生) *et al.* Fermentation, purification and identification of recombinant RCD-Hirudin. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2004, 20(1): 126 - 129
- [9] Zaliss R, Aumone L, Salles M. Novel composition and processes. United States Patent. 4870053. 1989
- [10] Nielsen S Suzanne. Food Analysis. China Light Industry Press, 2002